

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：84407

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659310

研究課題名(和文) 新型ウェルシュ菌エンテロトキシンの同定と食中毒事例への診断的応用

研究課題名(英文) Identification of novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* produced by human clinical isolates from outbreaks of acute gastroenteritis and application of diagnosis

研究代表者

余野木 伸哉 (Yonogi, Shinya)

大阪府立公衆衛生研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：20553613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)： ウェルシュ菌は食中毒の原因菌であり、腸管内で産生するエンテロトキシン(CPE)が食中毒の発生に必須と考えられていた。我々はCPE非産生ウェルシュ菌が原因と強く疑われる食中毒を2事例経験し、分離株を解析した。本研究において、我々は新型エンテロトキシンを同定し、BEC(binary enterotoxin of *Clostridium perfringens*)と命名した。また、BECの遺伝子検出系を構築し、食中毒検査に応用した。

研究成果の概要(英文)： *Clostridium perfringens* is a causative agent of food-borne gastroenteritis which for *C. perfringens* Enterotoxin (CPE) produced in intestinal tract has been considered an essential factor. We experienced two outbreaks of food-borne gastroenteritis in which non-CPE producers of *C. perfringens* were strongly suspected to be the cause and analyzed the clinical isolates. In this study, we identified a novel enterotoxin and named BEC (binary enterotoxin of *C. perfringens*). In addition, we developed detection method for becAB gene and applied to routine test of food-borne gastroenteritis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：ウェルシュ菌 食中毒 エンテロトキシン 新型エンテロトキシン BEC

1. 研究開始当初の背景

ウェルシュ菌は汚染食品の喫食後、腸管内でエンテロトキシン (CPE) を産生して下痢を起こす。しかし近年、CPE を産生しないウェルシュ菌による食中毒事例が報告され (東京都健康安全研究センター、<http://www.tokyo-eiken.go.jp/topics/clostridium/index.html>)、ウェルシュ菌新型エンテロトキシンの存在が示唆されていた (食品由来感染症と食品微生物 387-388 (中央法規)) が毒素は未同定であった。

申請者らは 2009 年と 2010 年に、疫学的にエンテロトキシン非産生性ウェルシュ菌が原因と考えられる 2 件の食中毒事例を経験した。分離菌株の培養上清の下痢原性を証明したのち、下痢原性を指標に新型エンテロトキシンの精製を行った。単一バンドを確認した精製毒素の N 末端アミノ酸配列解析および分離菌株ゲノム DNA の次世代シーケンサー解析によって、下痢原性毒素の候補としてウェルシュ菌イオタ毒素 b 成分と相同性を有するタンパク (後に BECb と命名) の ORF を特定した (BEC: binary enterotoxin of *Clostridium perfringens*)。この ORF の近傍にイオタ毒素 a 成分と相同性を有する ORF を確認した (この ORF がコードするタンパクを BECa と命名)。

以下、命名前の実験においても、便宜上、BECa (*becA*) および BECb (*becB*) として説明を行う。

2. 研究の目的

本研究は食中毒の原因菌と考えられる CPE 非産生ウェルシュ菌から新型エンテロトキシンを同定することを目的とする。また新型エンテロトキシンの迅速な検出系を構築して食中毒検査に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

組換え毒素の作製

BECa および BECb それぞれについて組換え毒素を作製した (rBECa および rBECb)。pGEX ベクター系を用いて GST 融合タンパクとして毒素を発現し、GST 融合タンパク精製カラムによって精製した。精製された GST 融合毒素はトロンピン処理によって GST を切断し、GST 融合タンパク精製カラムのフロースルーを回収することで GST を除去した。精製毒素は希釈を行い、サックリングマウス試験、ADP リボシル化活性の確認および Vero 細胞の形態変化の観察に供試した。

becB 欠損株の作製

Targetron gene knockout system (Sigma) を使用して *becB* 欠損株の作製を行った。pJIR750ai を使用し、*becB* suicide plasmid を作製し、製造者のマニュアルに従って *becB* 欠損株を作製した。

サックリングマウス試験

各希釈段階の毒素液を 0.1ml / 匹、経胃投与で哺乳マウスに接種した。26 日で 4 時間経過後、全体重および腸管の重量を測定した。FA 比 (fluid accumulation ratio) の計算は以下の式で行った。

FA 比 = 腸管重量 / (全重量 - 腸管重量)

ADP リボシル化活性の確認

組換え毒素のアクチンに対する ADP リボシル化活性を確認した。毒素 300µg と非筋肉精製アクチン 2µg を 10 mM のピオチン標識 NAD あるいは非標識 NAD⁺ とともにバッファー (20 mM Tris-HCl at pH 7.5, 1 mM dithiothreitol, 40 mM ATP, 40 mM CaCl₂, and 5 mM MgCl₂) 中で 37、60 分間反応させた。3×SDS サンプルバッファーを反応液に加え 95、5 分間の処理によって反応を停止した。反応液は SDS-PAGE に供試し、銀染色を行った。また、SDS-PAGE 後のタンパクは PVDF 膜に転写し、horseradish peroxidase-conjugated streptavidin によってピオチン標識 ADP リボシル化アクチンを検出した。

Vero 細胞の形態変化

コラーゲンコートされたスライドグラスを 24 ウェルプレートの各ウェルに設置し、各ウェルに 2×10⁴ の Vero 細胞を接種した。細胞は 10% の牛胎児血清の入った Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) で培養した。組換え毒素は細胞への接種前にトリプシン処理を行った。毒素は rBECa、rBECb それぞれ単独接種と rBECa および rBECb の同時接種を行った。3 時間後固定し、Alexa 594-conjugated wheat germ agglutinin (Invitrogen)、Alexa 488-conjugated phalloidin (Invitrogen)、Hoechst 33258 (Life Technologies) によって蛍光染色を行った。同様に毒素を接種し、ギムザ染色を行った。

4. 研究成果

本研究において、人の下痢症の新規原因物質として新型エンテロトキシンを同定し、BEC (binary enterotoxin of *C. perfringens*) と命名した。

becAB 遺伝子に対する検出系を構築し、検査へ応用した。

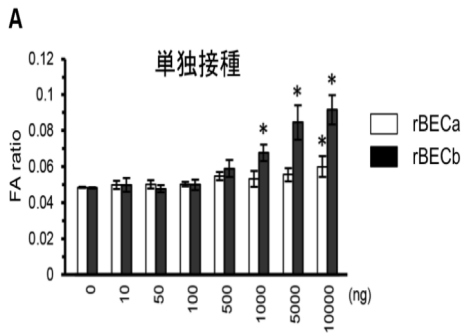
以下、実験結果について詳しく解説する。

組換え毒素の液体貯留活性

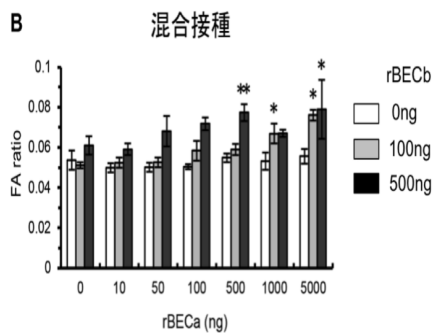
rBECb は単独で濃度依存的に液体貯留活性を示したが、rBECa は単独で液体貯留活性を示さなかった。(図1-A)

BECb 100ng (単独で液体貯留活性を示さない)に、BECa を加えて接種すると液体貯留活性が観察された。BECb 500ng の接種においても、BECa が加わることで液体貯留活性が増強された。(図1-B)

よって BECb が液体貯留活性における主体的な役割を果たし、BECa は補助的な働きをすると考えられる。



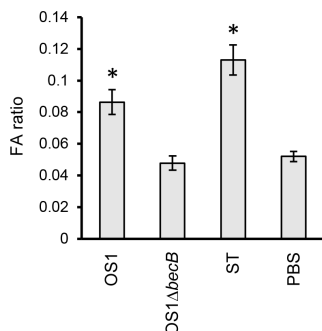
(図1-A) 組換え毒素の液体貯留活性 単独接種



(図1-B) 組換え毒素の液体貯留活性 混合接種

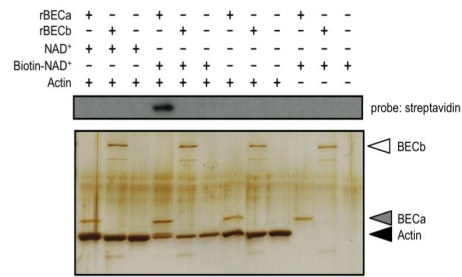
becB 欠損株の液体貯留活性

CPE 非産生ウェルシュ菌食中毒の分離株である OS1 の、becB 欠損株 OS1becB を作製した。OS1becB では液体貯留活性が消失した。(図-2)



(図-2) becB 欠損株の液体貯留活性

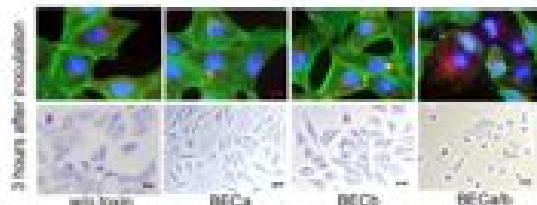
ADP リボシル化活性の確認
rBECa は ADP リボシル化活性を示したが、rBECb は示さなかった。(図-3)



(図-3) ADP リボシル化活性

Vero 細胞の形態変化

rBECa、rBECb それぞれ単独で細胞の形態変化は観察されなかった。rBECa と rBECb を同時に接種したとき (BECa/b)、細胞の円形化が観察された (図-4 上段: 蛍光染色、下段: ギムザ染色)



(図-4) Vero 細胞の形態変化

その他

本研究で調査した、2 事例の菌株の Sma、Apa 処理によるパルスフィールドゲル電気泳動像は事例内の分離菌株で一致したが、事例間では異なる泳動パターンを示した。一方、becAB 遺伝子が位置していたプラスミドは 2 事例間でほとんど同じであった。異なる系統の菌株に同じプラスミドが存在していたことから、水平伝搬によって becAB 遺伝子が拡散する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Yonogi S, Matsuda S, Kawai T, Yoda T, Harada T, Kumeda Y, Gotoh K, Hiyoshi H, Nakamura S, Kodama T, Iida T, BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks, *Infect Immun.*、査読有、2014 Mar 24. [Epub ahead of print]
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24664508>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

余野木 伸哉 (YONOGI Shinya)
大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・研
究員

研究者番号 : 20553613